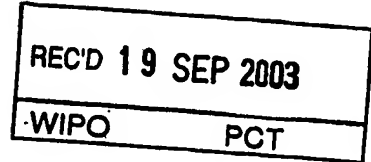


10/522877

PCT/JP03/09801

01.08.03

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年 8月 2日

出願番号
Application Number: 特願2002-226181
[ST. 10/C]: [JP2002-226181]

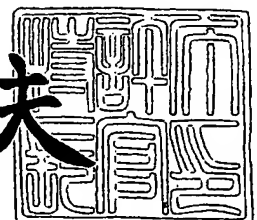
出願人
Applicant(s): 住友製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 9月 4日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 132979

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N021/00
C12Q001/04

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府大阪市此花区春日出中 3 丁目 1 番 9 8 号 住友製
薬株式会社内

【氏名】 砂川 洵

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府茨木市蔵垣内 1 丁目 3 番 4 5 号 住友製薬株式会
社内

【氏名】 植西 祐子

【特許出願人】

【識別番号】 000183370

【氏名又は名称】 住友製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100121588

【弁理士】

【氏名又は名称】 五十部 穰

【電話番号】 06-6466-5214

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 056546

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0205876

● 【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 細菌の細胞壁骨格成分の分析方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 細菌の細胞壁骨格成分（Cell Wall Skeleton、以下 CWS と称する。）の菌種・菌株の同定方法であって、以下の工程（1）～（3）を含むことを特徴とする方法；

（1）細菌の CWS 中に含まれる、高級脂肪酸を分離・抽出して高級脂肪酸画分を調製する工程、

（2）（1）の高級脂肪酸画分における、高級脂肪酸又はその誘導体をクロマトグラフィーにより分析する工程、

（3）（2）の分析結果に基づき、細菌の CWS の菌種・菌株を評価する工程。

【請求項 2】 高級脂肪酸又はその誘導体をクロマトグラフィーにより分析する（2）の工程が、以下の（a）～（b）の工程を含むことを特徴とする、請求項 1 記載の方法；

（a）高級脂肪酸画分、若しくは高級脂肪酸を標識化して高級脂肪酸誘導体を調製する工程、

（b）（a）の誘導体の溶出パターンを、クロマトグラフィーで分析する工程。

【請求項 3】 細菌の細胞壁骨格成分（Cell Wall Skeleton、以下 CWS と称する。）の力価検定方法であって、以下の工程（1）、（4）、および（5）を含むことを特徴とする方法；

（1）細菌の CWS 中に含まれる、高級脂肪酸を分離・抽出して高級脂肪酸画分を調製する工程、

（4）（1）の高級脂肪酸画分における、高級脂肪酸又はその誘導体の含量を分析する工程、

（5）（4）の分析結果に基づき、細菌の CWS の免疫賦活能を評価する工程。

【請求項 4】 高級脂肪酸又はその誘導体の含量を分析する（4）の工程が、以下の（a）～（b）の工程を含むことを特徴とする、請求項 3 記載の方法；

（a）高級脂肪酸画分、若しくは高級脂肪酸を標識化して高級脂肪酸誘導体を調製する工程、

(b) (a) の誘導体の含量を、クロマトグラフィーで分析する工程。

【請求項 5】 高級脂肪酸誘導体が高級脂肪酸エステルであることを特徴とする、請求項 2 又は 4 記載の方法。

【請求項 6】 細菌がミコバクテリウム属又はノカルジア属の細菌であることを特徴とする、請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】 ミコバクテリウム属の細菌が B C G 菌であることを特徴とする、請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】 高級脂肪酸がミコール酸であることを特徴とする、請求項 6 又は 7 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ミコバクテリウム属及びノカルジア属等の細菌の細胞壁骨格成分を有効成分として含有する医薬品の分析方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

ミコバクテリア属細菌の細胞壁骨格成分 (Cell Wall Skeleton。以下CWSと略する。) は、免疫賦活作用を有し、例えばミコバクテリウム属及びノカルジア属等の細菌の細胞壁骨格成分は動物モデルを用いた実験的腫瘍系およびヒト癌の免疫療法において、抗腫瘍活性を示すことが知られている。

【0 0 0 3】

ミコバクテリウム属及びノカルジア属等の細菌の細胞壁骨格 (Cell Wall Skeleton; 以下CWSと称する。) 成分と、油状物質を用いたエマルジョン製剤を担癌患者に投与すると、各種腫瘍に対して抗腫瘍効果を発揮することが報告されている (Pro. Japan Acad., 70, Ser.B 205-209 (1994) 及び Pro. Japan Acad., 74, SerB 20550-20555 (1998))。特に、免疫機能を維持している患者では優れた治療効果が認められることから、患者の免疫力を高める免疫賦活化療法として認識されるようになり、臨床例は増えつつある。

【0 0 0 4】

このようにミコバクテリウム属及びノカルジア属等の細菌のCWS成分を有効成分とする癌免疫療法用製剤の有用性が次第に明らかとなってきたが、その品質評価法を確立し、一般化するには次のような課題が存在した。

通常の医薬品では、有効成分の量を化学分析により測定することにより、その品質を評価することができるため、常に一定の品質を有する医薬品を製造し、その品質を保証することが容易である。

しかしながら、細菌のCWSは、ミコール酸等の高級脂肪酸、糖鎖、ペプチドグリカンからなる3層構造を有する生体高分子であり、水や有機溶媒に不溶である。そのため、HPLC、GC等の通常当業者に用いられる分析方法で分析することができない。

更に、ミコバクテリウム属及びノカルジア属等の細菌のCWSを油状物質と混ぜてエマルジョン化した製剤についても、原薬そのままをエマルジョンから分離、同定し、定量することは困難である。

【0005】

上記のように、化学的手法として、ミコバクテリウム属及びノカルジア属等の細菌のCWSをそのまま分析することは困難であることから、その構成成分である高級脂肪酸、糖、アミノ酸等を化学反応によって分解・単離し、同定及び定量する方法が報告されている。

例えば、高級脂肪酸については、細菌をアルカリ加水分解処理し、抽出することによって、高級脂肪酸を得ることができ、HPLC及びGCなどによって、その成分が混合物であることが確認されているとともに、各成分の構造決定が試みられている。

しかしながら、ミコバクテリウム属及びノカルジア属等の細菌のCWS、もしくはこれを有効成分として含有する医薬品の力価を化学的に定量的に測定する方法は、全く知られていない。

【0006】

一方、細菌は、属、種及び株によって構成成分が異なるが、結核菌、BCG菌等のミコバクテリウム属細菌の同定方法としては、遺伝子解析による方法のほか、ミコバクテリウム属細菌等に特徴的に存在するミコール酸を分析する方法が

知られている。すなわち、ミコバクテリウム属細菌等をアルカリ加水分解した後、有機溶媒でミコール酸を抽出し、これをHPLCで分析することにより、その溶出パターンから、属、種の同定が可能であることが報告されている (J. Clinical Microbiology, 1327-1330, May 1992)。

しかしながら、細菌のCWSの同定法は知られておらず、医薬品の確認試験法としてその属、種及び株を同定する方法も全く知られていない。

【 0 0 0 7 】

【発明が解決しようとする課題】

医薬品は、これを製造するにあたり、生産物を同定し、品質を一定に保つ必要があるが、細菌のCWSを有効成分とする医薬品については、原料菌体、原薬及び製剤中の有効成分を同定し、その力価を定量的に測定する方法は知られていない。そのため、該菌体、原薬及び製剤の品質を評価し、医薬品として有効成分の同一性を確認する方法が求められていた。本発明が解決しようとする課題は、細菌のCWSを有効成分とする医薬品の力価を定量的に測定し、用いられる細菌の属、種及び株を同定する方法、ならびに、細菌のCWSを有効成分とする医薬品及びその原料が標準品と同一の品質であることを検定する方法を確立することである。

【 0 0 0 8 】

【課題を解決するための手段】

ミコバクテリウム属のCWSには、構成成分として約30～45%の高級脂肪酸が含まれていることが知られているが、ミコバクテリウム属及びノカルジア属等の細菌の高級脂肪酸の量を、正確に定量する方法や、該高級脂肪酸によって細菌の属、種又は株を同定する方法は確立していなかった。また、該高級脂肪酸の量とミコバクテリウム属及びノカルジア属等の細菌の、CWSの生物活性との相関関係は全く知られていなかった。発明者らは、鋭意検討を重ねた結果、ミコバクテリウム属及びノカルジア属等の細菌のCWSに含まれる高級脂肪酸を抽出して分析することによって、ミコバクテリウム属及びノカルジア属等の細菌の菌種・菌株を同定し、該細菌のCWSの力価を評価できることを見出した。更に、検出感度を上げるべく誘導体へ変換した後、HPLC等で分析することによって

、高級脂肪酸の定量を効率的に行う方法を確立した。

一方、ミコバクテリウム属及びノカルジア属等の細菌のCWSは、ミコール酸等の高級脂肪酸、糖、アミノ酸等からなる生体高分子であるが、その成分、成分比、および分子量は、細菌の培養条件により異なる。そのため、ミコバクテリウム属及びノカルジア属等の細菌のCWSについては、その製造ロットごとの同等性、及び力価を評価する方法がなかった。

発明者らは、鋭意検討した結果、BCG菌のCWS（BCG-CWS）において、CWSに含まれるミコール酸の量と、BCG-CWSの生物活性が関連していることを見出した。具体的には、BCG-CWS標準品において、ミコール酸含量と、BCG-CWSの生物活性の一つであるTNF- α 産生誘導活性が比例関係を示すことがわかった（図4）。すなわち、ミコバクテリウム属及びノカルジア属等の細菌の、CWSの構成成分である高級脂肪酸を定量することにより、ミコバクテリウム属及びノカルジア属等の細菌の、CWSの免疫賦活剤、および／または、抗腫瘍剤としての力価を評価できることがわかった。また、菌体、原薬及び製剤から得た高級脂肪酸のクロマトグラムから、細菌の属、種及び株を同定できることがわかった。

本発明は、上記の知見を基に完成するに至ったものである。すなわち本発明は、

[1] 細菌の細胞壁骨格成分（Cell Wall Skeleton、以下CWSと称する。）の菌種・菌株の同定方法であって、以下の工程（1）～（3）を含むことを特徴とする方法；

（1）細菌のCWS中に含まれる、高級脂肪酸を分離・抽出して高級脂肪酸画分を調製する工程、

（2）（1）の高級脂肪酸画分における、高級脂肪酸又はその誘導体をクロマトグラフィーにより分析する工程、

（3）（2）の分析結果に基づき、細菌のCWSの菌種・菌株を評価する工程、

[2] 高級脂肪酸又はその誘導体をクロマトグラフィーにより分析する（2）の工程が、以下の（a）～（b）の工程を含むことを特徴とする、[1]記載の方法；

(a) 高級脂肪酸画分、若しくは高級脂肪酸を標識化して高級脂肪酸誘導体を調製する工程、

(b) (a) の誘導体の溶出パターンを、クロマトグラフィーで分析する工程、

[3] 細菌のCWSの菌種・菌株を評価する(3)の工程が、細菌のCWSの標準品と比較することを含む、[1]又は[2]記載の方法、

[4] 細菌の細胞壁骨格成分(Cell Wall Skeleton、以下CWSと称する。)の力価検定方法であって、以下の工程(1)、(4)、および(5)を含むことを特徴とする方法；

(1) 細菌のCWS中に含まれる、高級脂肪酸を分離・抽出して高級脂肪酸画分を調製する工程、

(4) (1) の高級脂肪酸画分における、高級脂肪酸又はその誘導体の含量を分析する工程、

(5) (4) の分析結果に基づき、細菌のCWSの免疫賦活能を評価する工程、

[5] 高級脂肪酸又はその誘導体の含量を分析する(4)の工程が、以下の(a)～(b)の工程を含むことを特徴とする、[4]記載の方法；

(a) 高級脂肪酸画分、から蛍光標識された高級脂肪酸誘導体を調製する工程、

(b) (a) の誘導体の含量を、クロマトグラフィーで分析する工程。

[6] 細菌のCWSの免疫賦活能を評価する(5)の工程が、細菌のCWSの標準品と比較することを含む、[4]又は[5]記載の方法、

[7] 高級脂肪酸誘導体が高級脂肪酸エステルであることを特徴とする、[1]～[6]のいずれか記載の方法。

[8] 高級脂肪酸誘導体が、蛍光標識された誘導体であることを特徴とする[7]記載の方法。

[9] 細菌がミコバクテリウム属又はノカルジア属の細菌であることを特徴とする、[1]～[8]のいずれかに記載の方法。

[10] ミコバクテリウム属の細菌がBCG菌であることを特徴とする、[1]～[8]のいずれかに記載の方法。

[11] 高級脂肪酸がミコール酸であることを特徴とする、[8]～[10]のいずれかに記載の方法。

に関するものである。

【0009】

【本発明の実施の態様】

以下本発明の実施の態様について詳細に説明する。

本明細書において、「細菌」としては、グラム陽性桿菌のミコバクテリウム属細菌、ノカルジア属細菌、コリネバクテリウム属細菌、ロドコッカス属細菌、ゴルドナ属細菌などが挙げられる。「ミコバクテリア属細菌」とは、抗酸菌のミコバクテリウム属の細菌を表し、具体的には、結核菌群細菌の *Mycobacterium tuberculosis* (結核菌)、*Mycobacterium bovis* (ウシ型結核菌、BCG菌を含む)、*Mycobacterium africanum* (アフリカ菌)、*Mycobacterium microti* (ネズミ型結核菌) があり、この他、*Mycobacterium leprae* (ライ菌)、非結核性抗酸菌群である *Mycobacterium kansasii*、*Mycobacterium avium*、*Mycobacterium phlei* 等が挙げられる。

「細胞壁骨格成分 (CWS)」とは、細菌を物理的に粉碎した後、除核酸、除蛋白、脱脂などの精製工程を経て、不溶性残渣として得られるものを表し、その製法は公知である (J. Nat. Cancer Inst., 52, 95-101 (1974))。

「高級脂肪酸」とは、ミコバクテリウム属細菌、ノカルジア属細菌、コリネバクテリウム属細菌、ロドコッカス属細菌、ゴルドナ属細菌等の細胞壁に特徴的に存在する高級脂肪酸を表す。高級脂肪酸としては、例えばミコール酸が挙げられ、該ミコール酸とは、 α -アルキル- β -ヒドロキシ脂肪酸を表し、総炭素数約22~90を有する。このうちミコバクテリウム属の総炭素数は約60~90であり、ノカルジア属では約44~60であり、通常複数種類の分子の混合物として単離される。ミコール酸の α 鎖は、直鎖の炭化水素からなり、その長さは属・種によって異なり、C22~C26を中心とし、幅広い分布を有する。一方、 β 鎖にはすべてのミコバクテリアに共通する α -ミコール酸 (シクロプロピル基および/又は二重結合が存在) の他、菌株によって種々サブミコール酸 (メトキシ基、ケト基、エポキシ基、メチル基等) の官能基が存在することがわかっている。例えば、BCG-東京株では α -、メトキシ-及びケト-ミコール酸が存在する。

本明細書において、「力価」とは、一定重量、または一定容量の、ミコバク

テリウム属及びノカルジア属等の細菌のCWSもしくは該CWSを含有する医薬品の生物活性の強さ、または検定された標準品との相対的な値を表す。

該医薬品としては、該CWSの溶媒懸濁液；鉱物油、スクワラン、もしくはスクワレン等の油状物との混合物；該混合物を含有するエマルション溶液；または、前記水懸濁液もしくはエマルション溶液を凍結乾燥して得られるもの等が挙げられる。

また、該生物活性とは、ミコバクテリウム属及びノカルジア属等の細菌のCWSの免疫賦活活性、および／または抗腫瘍活性を表し、当業者に公知の、in vivoおよびin vitroの任意の活性が挙げられる。具体的には、インターフェロン γ 誘導活性、TNF- α 誘導活性、実験的腫瘍動物モデルに対する抗腫瘍活性等が挙げられる。

【0010】

本発明の第1の実施の態様は、ミコバクテリウム属及びノカルジア属等の細菌のCWSに含まれる高級脂肪酸のクロマトグラムから定性的にその菌種・菌株を同定、確認する方法であり、以下の工程(1)～(3)を含む方法である。すなわち、

- (1) ミコバクテリウム属及びノカルジア属等の細菌のCWSに含まれる、高級脂肪酸を分離・抽出して高級脂肪酸画分を調製する工程
- (2) (1)の高級脂肪酸又はその誘導体をクロマトグラフィーにより分析する工程、
- (3) (2)の分析結果に基づき、細菌のCWSの菌種・菌株を評価する工程。

【0011】

以下、各工程について詳細に説明する。

- (1) ミコバクテリウム属及びノカルジア属等の細菌のCWSより、高級脂肪酸を分離・抽出して高級脂肪酸画分を調製する工程

試料として一定質量のミコバクテリウム属及びノカルジア属等の細菌のCWSを秤量し、溶媒中で、10℃～溶媒の沸点の範囲内で塩基を反応させることにより、加水分解を行う。ここで用いられる溶媒としては、加水分解を行うに十分な

水を含む有機溶媒であれば特に限定されないが、具体的な有機溶媒としては、例えばエタノール、メタノール、イソプロパノール、エチレングリコール等のアルコール性溶媒、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル、ジオキサン等のエーテル系溶媒、アセトン、ジメチルスルホキシド等の親水性溶媒、トルエン、キシレン等の芳香族炭化水素系溶媒、ヘキサン、ヘプタン等の脂肪族炭化水素系溶媒、クロロホルム、ジクロロメタン、ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素系溶媒、またはこれらの有機溶媒の任意の溶媒の混合物が挙げられる。

前記有機溶媒として、好ましくは、エタノール等のアルコール系溶媒、あるいは、前記アルコール系溶媒および疎水性有機溶媒の混合物が挙げられ、具体的には、エタノール-トルエン-水混液等が挙げられる。

反応温度は、用いられる有機溶媒の種類によって適当な温度を選択することができるが、好ましくは、室温～溶媒の沸点で加温するか、あるいは105℃～135℃でオートクレーブを用いる方法が挙げられる。

加温の場合の反応時間としては、5分～72時間が挙げられ、高級脂肪酸のパターンを分析する場合の反応時間としては、好ましくは5分～5時間、高級脂肪酸量を定量的に分析する場合の反応時間としては、好ましくは30分～5時間が挙げられる。オートクレーブの場合の反応時間としては、5分から8時間が挙げられ、好ましくは、パターンを分析する場合は5分～3時間、定量的に分析する場合は10分～5時間が挙げられる。

使用される塩基としては、当業者に知られたものであれば任意の塩基を用いることができるが、具体的には、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化バリウム、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸バリウム、炭酸セシウム等の無機塩基が挙げられる。

ここで、被験サンプルが原薬の場合、反応効率を上げるために、試料をそのまま一定質量秤量するか、またはトルエン、クロロホルム、ヘプタン及びエタノール等から選択される有機溶媒、またはこれらの溶媒の混液等に懸濁し、必要量を採取し、該有機溶媒を留去した後、加水分解に供することが好ましい。また、被験サンプルが細菌の菌体である場合は、水に懸濁した状態で、原薬と同様に加水分解を行うほか、反応効率を上げるために温度を沸点まで上げて5分～72時間

反応させるか、オートクレーブを用いて5分～8時間反応させることが好ましい。医薬品製剤の場合は、水を加えてエマルションを形成させ、その全部又は一部を採取して加水分解反応させるほか、反応効率を上げるために、一旦水でエマルションとするのではなく、直接加水分解試液を加えて、反応させることが好ましい。

加水分解反応終了後、酸を加えて反応溶液を酸性とした後、疎水性有機溶媒を用いて高級脂肪酸画分を抽出する。ここで用いられる酸としては、当業者に知られたものであれば任意の酸を用いることができるが、具体的には、塩酸、硫酸、燐酸等の無機酸、トリフルオロ酢酸等の有機酸、スルホン基を有する酸性イオン交換樹脂等を用いることができる。疎水性溶媒は、水層との分離が可能な溶媒であれば特に限定はないが、具体的には、ヘキサン、ヘプタン、ジエチルエーテル、トルエン、クロロホルム等が挙げられる。

【0012】

(2) (1) の高級脂肪酸又はその誘導体をクロマトグラフィーにより分析する工程

(1) において得られた高級脂肪酸画分に含まれる高級脂肪酸又はその誘導体のクロマトグラムを得、その溶出パターンを確認する。該溶出パターンとは、溶出ピークの形状、各溶出ピークの保持時間（リテンションタイム）、ピーク面積、ピーク幅、もしくは極大値等のパラメーター、および、各溶出ピーク間の該パラメーターの比等、クロマトグラムにおける任意の性質を表す。その確認方法は、当業者に公知の方法であれば、任意の方法を用いることができる。高級脂肪酸、又は、高級脂肪酸をエステル化もしくはアミド化することにより調製される、高級脂肪酸の誘導体を、HPLC、GC、TLC等で分析し、高級脂肪酸又はその誘導体のクロマトグラムを得ることができる。ここで、高級脂肪酸又は高級脂肪酸の標識化誘導体におけるクロマトグラムは、HPLCもしくはGCにおけるクロマトグラム、すなわちピークの溶出パターンや、TLCにおけるスポットの検出パターン等を表す。また、検出方法としては、特に限定はないが、蛍光、UV-VIS、ラジオアイソトープ、RI（示差屈折計）、質量分析、電気化学、又はレーザー励起吸光等を用いることができる。

好ましくは、高級脂肪酸に標識化試薬を作用させることにより、標識化高級脂肪酸誘導体を調製した後、その溶出パターンを分析する方法等が挙げられる。

高級脂肪酸の標識化方法としては、高級脂肪酸のカルボン酸を、蛍光、UV-VIS、ラジオアイソトープ、RI（示差屈折計）、質量分析、電気化学、レーザー励起吸光等で検出可能な原子もしくは部分構造を有する高級脂肪酸エステル、または高級脂肪酸アミドへ導く方法が挙げられる。

具体的な標識化高級脂肪酸誘導体としては、高級脂肪酸のカルボキシル基と反応するプロモメチル（プロモアセチル）基、ジアゾメチル基、アミノ基、ヒドラジノ基などを有するとともに、同時に紫外、可視又は蛍光で検出可能な置換基を有する9-アントリルメチルエステル、p-ブロモフェナセチルプロマイド、4-プロモメチル-6,7-ジメトキシクマリン等が挙げられる。

誘導化反応条件としては、個々の標識化高級脂肪酸誘導体に適当な条件を、当業者によく知られた方法から選択することができるが、通常は、必要に応じて塩基もしくは酸等の補助試薬の存在下、-10℃～溶媒の沸点で5分～72時間標識化試薬と反応させることにより、標識化高級脂肪酸誘導体を調製することができる。具体的には、9-アントリルメチルエステルの場合、高級脂肪酸画分を、ADAM（9-アントリルジアゾメタン）等の蛍光標識化試薬を用いて、-10℃～溶媒の沸点で5分～72時間、好ましくは20℃～60℃で3時間～12時間反応させることによって、高級脂肪酸9-アントラニルメチルエステルを得ることができる。

分析方法としては、HPLC、GC、TLC等、当業者によく知られた方法を用いることができる。例えば、分析される高級脂肪酸、もしくは標識化高級脂肪酸誘導体の性質に応じて、HPLCの逆相クロマトグラフ法、順相クロマトグラフ法、疎水クロマトグラフ法、イオン交換クロマトグラフ法、イオンクロマトグラフ法、サイズ排除クロマトグラフ法、アフィニティークロマトグラフ法において、溶出される高級脂肪酸もしくは標識化高級脂肪酸誘導体を含有する複数のピークのパターンを得ることができる。ここで検出方法としては、前記標識化方法に応じて、蛍光分析、UV-VIS分析、ラジオアイソトープ分析、RI（示差屈折計）分析、質量分析、電気化学分析、又はレーザー励起吸光等が挙げられる。

【0013】

(3) (2) の分析結果に基づき、細菌のCWSの菌種・菌株を評価する工程
一般的には、被験サンプル、すなわち評価対象の細菌のCWSにおける(2)のクロマトグラムと、基準となる該細菌のCWSの標準品における(2)のクロマトグラムのパターンを比較することにより、被験サンプルの菌種・菌株を同定、確認することができる。また、被験サンプルである細菌のCWSが、同種同株の標準サンプルと、CWSの構成成分において等価であるか否かを評価することができる。すなわち、細菌の培養条件によって、同種同株である場合でも該構成成分は変化する可能性があるが、(2)の分析結果を標準品と比較することにより、CWSの構成成分において等価な菌株であることを同定することができる。

具体的には、例えば高級脂肪酸がミコール酸である場合、逆相HPLCカラム(ODSカラム 4.6mmφ×15cm、粒径5μm)を使用し、メタノール/水混液(9:1)と2-プロパノールのグラジエント条件で分析した場合は約26~33分に溶出する画分、あるいは、逆相HPLCカラム(ODSカラム 4.6mmφ×7.5cm、粒径3μm)を使用し、メタノールとジクロロメタンのグラジエント条件で分析した場合は約6~9分に溶出する画分のクロマトグラムが、それぞれ高級脂肪酸のパターンに相当する。

【0014】

本発明の、第2の実施の態様は、ミコバクテリウム属及びノカルジア属等の細菌のCWSを含む被験サンプルにおけるCWSの含量を定量して評価するとともに、有効成分量すなわち力価を検定、評価する方法であり、以下の工程(1)、(4)、および(5)を含む方法である。すなわち、

(1) 細菌のCWS中に含まれる、高級脂肪酸を分離・抽出して高級脂肪酸画分を調製する工程、

(4) (1)の高級脂肪酸又はその誘導体の含量を分析する工程、

(5) (4)の分析結果に基づき、細菌のCWSの免疫賦活能を評価する工程。

以下、それぞれの工程について具体的に述べる。

(1) ミコバクテリウム属及びノカルジア属等の細菌のCWSより、高級脂肪

酸を抽出してその含有画分を調製する工程

この工程については前記のとおりである。

(4) (1) の高級脂肪酸又はその誘導体の含量を分析する工程

(1) で得られる高級脂肪酸を含む画分を、前記(2)に記載された方法で分析し、得られたクロマトグラムより高級脂肪酸又は高級脂肪酸誘導体の量を定量すればよい。すなわち、前記(2)のクロマトグラムにおいて、高級脂肪酸又は高級脂肪酸誘導体に相当する複数のピークの、面積値の総和を算出することにより、高級脂肪酸を定量することができる。

なお、細菌、又は、細菌のCWSを有効成分として含有する医薬品の原薬もしくは製剤の定量分析において、内部標準を使用する場合、該内部標準としては、HPLC等の分析において、被験サンプルもしくは標準品と分離して、検出可能であれば、特に限定されない。また、上記(1)、(2)、及び(4)のいずれの工程で添加してもよい。

【0015】

(5) (4) の分析結果に基づき、細菌のCWSの免疫賦活能を評価する工程

一般的には、被験サンプル、すなわち評価対象の細菌のCWSにおける(4)の値と、基準となる該細菌(被験サンプルと同種・同株の細菌)におけるCWSの標準品における(4)の値を比較することによって、被験サンプルの力価を評価することができる。例えば、BCG-CWS・東京株の場合、高級脂肪酸はミコール酸であり、被験サンプルのミコール酸の含量を前記(1)および(4)の工程によって分析した結果を、BCG-CWS・東京株の標準品におけるミコール酸の含量と比較することにより、被験サンプルの力価を定量することができる。

被験サンプル、すなわち評価対象の細菌のCWSにおける(4)の値と、基準となる該細菌のCWSの標準品における(4)の値を比較することにより、被験サンプルの力価を評価することができる。

具体的には、ミコバクテリウム属及びノカルジア属等の細菌のCWSの標準品における(4)の値： V_{std} を、被験サンプルにおける(4)の値： V_{sam} と比較することにより、被験サンプルの力価を、標準品に対して、下式(%)：

$V_{\text{sam}}/V_{\text{std}} \times 100$ (%) で表すことができる。

ここで、好ましくは、標準品における(4)の値を、複数の濃度で、複数回数測定し、標準品の濃度と、高級脂肪酸量の相関関係を表す検量線を作成し、該検量線に被験サンプルにおける高級脂肪酸量の測定値(すなわち(4)の値)を当てはめることにより、被験サンプルにおける有効成分量、すなわち力価を逆算することができる。

【0016】

本発明の方法により、ミコバクテリウム属及びノカルジア属等の細菌のCWSだけでなく、ミコバクテリウム属及びノカルジア属等の細菌、ミコバクテリウム属及びノカルジア属等の細菌のCWSを含有する医薬品の有効成分を同定、確認するとともに、力価を評価することも可能である。すなわち、前記と同様の方法で、一定量の菌体、又は医薬品から、水又は有機溶媒等の懸濁液を調製し、該菌体又は医薬品中の高級脂肪酸の量を測定することができる。

【0017】

以下、ミコバクテリウム属細菌のCWSよりミコール酸を抽出して行う方法について、実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものではない。

【実施例】

実施例1 BCG-CWSに含まれるミコール酸の定量

(1) 溶液の調製

① BCG-CWSは、BCG菌東京株(日本ビーシージー製)から、公知の方法で調製した。BCG-CWSの被験サンプル、及び生物活性が確認されているBCG-CWSの標準品約15mgをそれぞれ精密に量り、トルエン又はヘプタン/エタノール(99.5)混液(9:1)を加えて正確に25mLとし、超音波を15分間照射し、試料原液及び標準原液とした。試料原液2mLを正確に量り、溶媒を留去した。また、標準原液1、2及び3mLを正確に量り、同様に溶媒を留去した。

③ 試料溶液及び標準溶液にそれぞれ内標準溶液(エルカ酸(アルドリッチ製)のトルエン溶液(1g/5000mL))100 μ Lを正確に加えた。

④ 水酸化カリウムのエタノール(99.5)/トルエン/水混液(10:10:1)溶液(1

g/40mL) 1 mLを加え、超音波を1分間照射した。

⑤ 65℃の恒温槽で3時間加熱し、放冷後、2mol/L塩酸500 μ Lを正確に加え、よく振り混ぜた。さらにヘキサン2mLを加え、よく振り混ぜた後静置し、上層（有機層）をサンプル瓶に移した。同操作を、ヘキサン1mLずつを用いて、更に2回繰り返した。

⑥ 集めた上層に水1mL加え、よく混ぜ、遠心分離を行ったのち、水層（下層）を除去した。前記操作を更に1回繰り返した。

⑦遠心型エバポレーターを用いて上層の溶媒を留去した。

⑧残渣にトルエン4mLを加えて溶かした後、この溶液200 μ Lをサンプル瓶に正確に量り、さらにトルエン300 μ L及び蛍光標識化試液（ADAM（9-Anthryldiazomethane; フナコシ製）のアセトン溶液（1 g/250mL）を更にメタノールで正確に10倍に希釈したもの）500 μ Lを加え、40℃で5時間以上反応させた。反応終了後、すみやかに5℃に冷却した。これらをそれぞれ試料溶液及び標準溶液として分析に供した。

(2)分析

試料溶液及び標準溶液の各 10 μ LをHPLCにて以下の条件で分析した。

試料溶液からクロマトグラムのミコール酸に由来する複数ピークの溶出パターンと、標準溶液のそれと比較した。また、内標準物質のピーク面積に対するミコール酸誘導体のピーク面積比を求め、標準溶液から得られた検量線を用いて、被験サンプルの力価を求めた。

[高速液体クロマトグラフィー（HPLC）の設定条件]

カラム温度：50℃

カラム：関東化学製 Mightysil（登録商標） RP-18 GP 150-4.6（5 μ m、4.6mm ϕ ×15cm）

溶媒： A液：メタノール/水混液(9:1) B液：2-プロパノールグラジエント条件を表1に示した。

【表1】

min	0	25	35	36	39
-----	---	----	----	----	----

A(%)	90	5	5	90	90
B(%)	10	95	95	10	10

移動相の流速： 1.5mL/min

蛍光検出条件：

励起波長：365 nm

検出波長：412 nm

(3)結果

図 1 に代表的なクロマトグラム、図 2 に標準品について複数濃度でミコール酸含量を測定した結果をプロットして作成した検量線を示した。

試料溶液のミコール酸の溶出パターンは、標準溶液と比較し、同様の位置に同様の強度のピークを認めることを確認した。また、被験サンプルの測定結果から図 2 の検量線を用いて力価を算出した結果を、表 2 に示した。

【表 2】

試料(ロット番号)	力価(%)
0023	100
0104	96
0107a	98

力価(%) = 検量線から得られた試料中の CWS 量 / 試料の採取量 × 100

上記のように、BCG-CWS を有効成分として含有する医薬品の原料となる BCG-CWS の各製造ロットにおける力価を評価することができた。

【0018】

実施例 2 菌株の同定及び定量

(1)溶液の調製

- ①BCG 菌東京株（日本ビーシー製）を公知の方法で死滅したものを約 10mg（CWS 量に換算して）を精密に量り、水酸化カリウムのエタノール(99.5)／水

混液 (1:1) 溶液 (1g/4mL) 2mLを加えて、100℃で2時間反応させた。放冷後、6mol/L塩酸1.5mLを加えて酸性にし、よく振り混ぜた。

② 別に、生物活性が確認されているBCG-CWSの標準品約15mgを精密に量り、トルエン又はヘプタン/エタノール(99.5)混液(9:1)を加えて正確に25mLとし、超音波を15分間照射し、標準原液とした。標準原液1、2及び3mLを正確に量り、溶媒を留去した。水酸化カリウムのエタノール(99.5)/トルエン/水混液 (10:10:1) 溶液 (1g/40mL) 1mLを加え、超音波を1分間照射した。65℃の恒温槽で3時間加熱し、放冷後、2mol/L塩酸500 μ Lを正確に加え、よく振り混ぜた。

③ 試料溶液及び標準溶液にそれぞれヘキサン2mLを加え、よく振り混ぜた後静置し、上層 (有機層) をサンプル瓶に移した。同操作を、ヘキサン1mLずつを用いて、更に2回繰り返した。

④ 集めた上層に水1mL加え、よく混ぜ、遠心分離を行ったのち、水層 (下層) を除去した。前記操作を更に1回繰り返した。

⑤ 遠心型エバポレーターを用いて上層の溶媒を留去した。

⑥ 残渣にトルエンを約0.3mg/mL (CWS量に換算して) となるよう一定量を正確に加えて溶かし、この溶液200 μ Lをサンプル瓶に正確に量り、さらにトルエン300 μ L及び蛍光標識化試薬 (ADAM (9-Anthryldiazomethane) ;フナコシ製) 500 μ Lを加え、40℃で5時間以上反応させた。反応終了後、すみやかに5℃に冷却した。これらをそれぞれ試料溶液及び標準溶液として分析に供した。

(2)分析

試料溶液及び標準溶液の各10 μ LをBCG-CWSのHPLCと同じ試験条件で分析した。試料溶液からクロマトグラムのミコール酸に由来する複数ピークの溶出パターンと、標準溶液のそれと比較した。また、試料溶液のミコール酸誘導体のピーク面積を求め、標準溶液のミコール酸誘導体のピーク面積から得られた検量線を用いて、被験サンプル (菌体) におけるCWS含量 (%) を求めた。

(3)結果

被験サンプルの測定結果を表3に示した。

【表 3】

試料	C W S 含量(%)
菌体 032B	4.5
菌体 036B	5.7
菌体 037B	5.5
菌体 041B	5.8

C W S 含量(%) = 検量線から得られた試料中の C W S 量 / 試料の採取量 × 100

上記のように、B C G - C W S を有効成分として含有する医薬品の原料となる B C G 菌・東京株の菌体について、各製造ロットにおける有効成分量を評価することができた。

【 0 0 1 9 】

実施例 3 凍結乾燥製剤の分析例

(1) 溶液の調製

① B C G - C W S 凍結乾燥製剤は参考例 1 に記載された方法で調製した。生物活性が確認されている B C G - C W S 凍結乾燥製剤の標準品約 15mg を精密に量り、トルエン又はヘプタン/エタノール (99.5) 混液 (9:1) を加えて正確に 25mL とし、超音波を 15 分間照射し、標準原液とした。標準原液 1、2 及び 3mL を正確に量り、溶媒を留去した。標準原液に内標準溶液 (エルカ酸 (アルドリッチ製) のトルエン溶液 (1 mL / 5000mL)) 100 μ L を正確に加え、水酸化カリウムのエタノール (99.5) / トルエン / 水混液 (10:10:1) 溶液 (1 g / 40mL) 1 mL を加え、超音波を 1 分間照射した。

② B C G - C W S 凍結乾燥製剤の被験サンプルを精密に量り、内標準溶液 100 μ L を正確に加え、水酸化カリウムのエタノール (99.5) / トルエン / 水混液 (10:10:1) 溶液 (1 g / 40mL) 1 mL を加え、超音波を 1 分間照射した。

以下、実施例 1 と同様に加水分解を行い、ミコール酸を溶媒抽出し、標識化を行った。

(2) 分析

試料溶液及び標準溶液の各 10 μ L を H P L C にて以下の条件で分析した。

試料溶液からクロマトグラムのみコール酸に由来する複数ピークの溶出パターンと、標準溶液のそれと比較した。また、内標準物質のピーク面積に対するみコール酸誘導体のピーク面積比を求め、標準溶液から得られた検量線を用いて、被験サンプルの力価を求めた。

(3) 結果

被験サンプルの測定結果を表4に示した。

【表4】

Lot No.	力価(%)
CWD204	103
CWD205	101
CWD206	110

力価(%) = 検量線から得られた製剤中のCWS量 / 製剤中の原薬の表示量 × 100

上記のように、BCG-CWSを有効成分として含有する医薬品について、各製造ロットにおける力価を評価することができた。

【0020】

実施例4 BCG-CWSの菌株の同定

実施例1と同様の方法でBCG菌東京株のCWSと、BCG菌パスツール株のCWSの、みコール酸の溶出パターンをHPLCで分析した。結果を図3に示した。

図3からわかるように、BCG菌の株の種類によって、含まれるみコール酸の分子種及びみコール酸分子の量比が異なり、クロマトグラムで判別できることが明らかとなった。

【0021】

参考例1 BCG-CWS凍結乾燥製剤

菌体成分としてBCG-CWS2640mgを用いて、スクワラン35.2gおよび10%エタノール/90%ヘプタン400mLの混合液に加え、振とうあるいは超音波により室温で分散した。その後、窒素気流下60℃に加熱し、攪拌下溶媒を留去した。ついで

、0.02w/w%ポリソルベート80水溶液924gを添加し、ホモミキサーを用いて粗乳化（7,000rpm（逆回転）/min×5分間）を行い、さらに、36.6gの10w/w%ポリソルベート80水溶液を添加し本乳化（12,000rpm（正転）/min×10分間）を行った。最後に、1.5gの10w/w%ポリソルベート80溶液を添加混合し攪拌（7,000rpm（逆回転）×1分間）し、ポリソルベート80最終濃度を0.4w/w%に調整し、水中油型エマルジョンを得た。その後、4w/w%マンニトール水溶液3500gを添加し、4000gの最終製剤を得た。

この水中油型エマルジョン製剤をバイアルに2mLずつ分注し、凍結乾燥を行ってBCG-CWS凍結乾燥製剤を得た。

【0022】

参考例2 BCG-CWS標準品の生物活性評価

（1）方法

RAW264.7細胞を96穴プレートに播種後37℃、5%二酸化炭素、湿条件で5時間培養し、複数濃度のBCG-CWS（標準品）の生理食塩水懸濁液を添加して、更に約15時間培養した。培養上清のTNF- α 量をAN'ALYZA（登録商標）Mouse TNF- α Immunoassayキットを用いてELISA測定を行った。付属の手順書に従い、450 nmの吸光度を測定することによって測定した。上記BCG-CWSの生理食塩水懸濁液のミコール酸含量を、実施例1記載の方法で測定した。

（2）結果

測定したBCG-CWSのミコール酸含量とTNF- α 量をプロットした結果を図4に示した。

上記の結果から、BCG-CWS標準品において、本発明の方法で検定したミコール酸含量の分析値と、実際の生物活性値（TNF- α 産生誘導活性）が相関していることがわかった。すなわち、ミコール酸含量を生物活性の力価の指標として用いることができることが確認できた。

【0023】

【発明の効果】

本発明により、ミコバクテリウム属及びノカルジア属等の細菌のCWSに含有する高級脂肪酸又はその誘導体のクロマトグラムのパターンから原料菌体、原

薬及び製剤で用いている細菌の属、種及び株を同定、確認することができた。また、ミコバクテリウム属及びノカルジア属等の細菌のCWSを含有する原料菌体、原薬及び製剤の力価を定量的に評価することが可能になった。このことにより、ミコバクテリウム属及びノカルジア属等の細菌のCWS及びそれを有効成分とする医薬品の品質を一定に保ち、ミコバクテリウム属及びノカルジア属等の細菌のCWSを含有する医薬品を提供することが可能になった。

【0024】

【図面の簡単な説明】

【図1】 被験サンプルのクロマトグラムを示す図であり、横軸はHPLCの保持時間、縦軸は蛍光強度を示す。

【図2】 BCG-CWS原薬の標準品の検量線を示す図である。

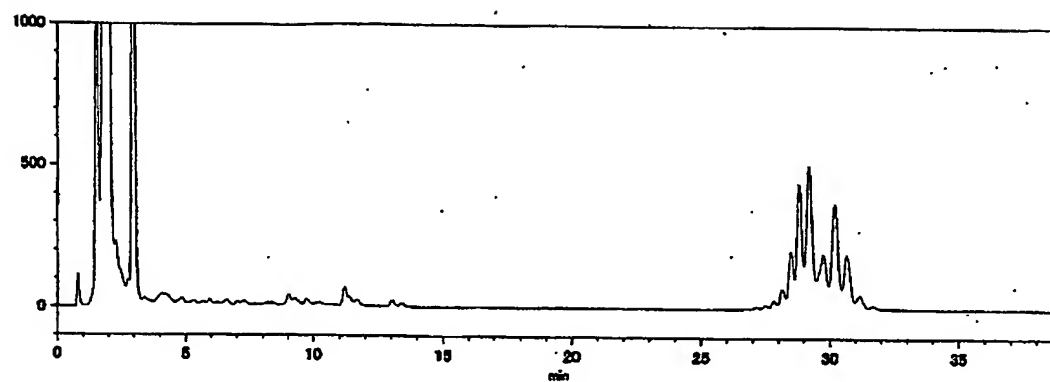
【図3】 細菌の菌株による違いで、クロマトグラムから同定できる（上図：BCG菌の東京株、下図：BCG菌のパスツール株）。

【図4】 被験物質のミコール酸量と生物活性の相関関係を示す図である。

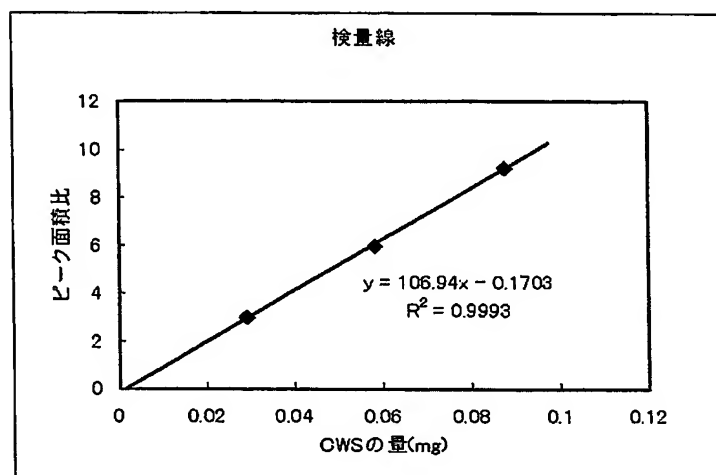
【書類名】

図面

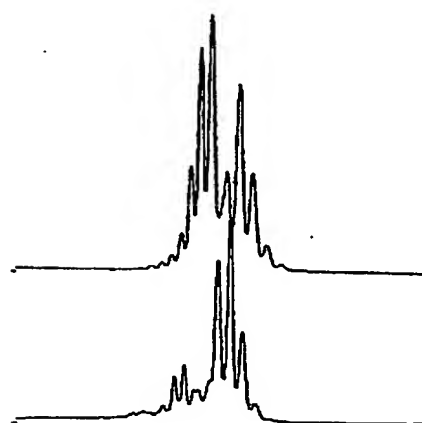
【図 1】



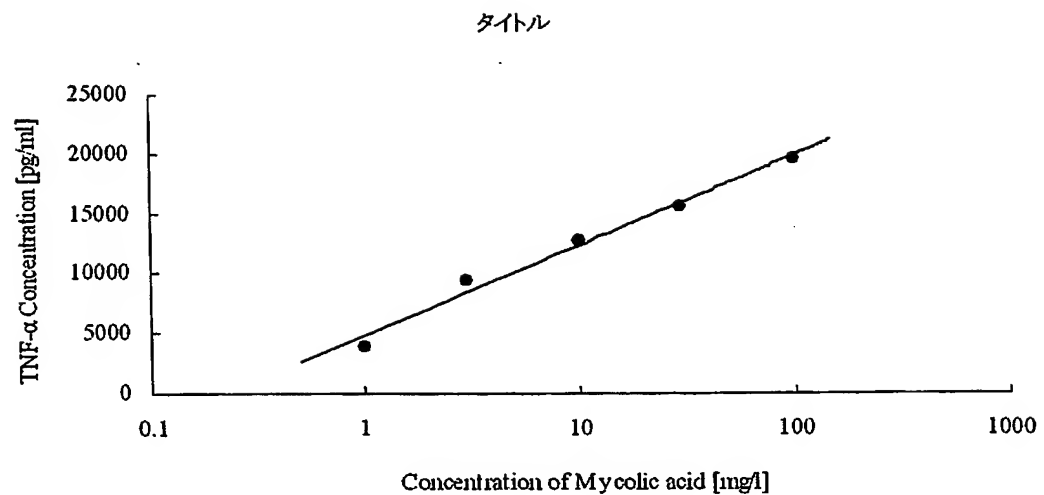
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 細菌の細胞壁骨格成分 (Cell Wall Skeleton、以下CWSと称する。
) の分析方法を提供する。

【解決手段】 細菌細胞壁骨格成分に含まれる高級脂肪酸又はその誘導体を分析することによって、細菌の細胞壁骨格成分を有効成分として含有する医薬組成物、およびその原料の品質を評価し、力価を検定し、有効成分を同定することが可能となった。

【選択図】 なし。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-226181
受付番号	50201149835
書類名	特許願
担当官	第一担当上席 0090
作成日	平成14年 8月 5日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年 8月 2日
-------	-------------

次頁無

特願2002-226181

出願人履歴情報

識別番号

[000183370]

1. 変更年月日

1990年 8月 9日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

氏 名

住友製薬株式会社